中间锦鸡儿 *CiMYB15* 基因正调控拟南芥黄酮代谢*

柴文娟[1] 杨杞[1, 2, 3] 李国婧[1, 2, 3] 王瑞刚[1, 2, 3]**

（1 内蒙古农业大学 生命科学学院 呼和浩特 010018 2 内蒙古自治区植物逆境生理与分子生物学重点实验室 呼和浩特 010018 3 内蒙古自治区抗逆植物遗传资源利用与分子改良科技创新团队 呼和浩特 010018）

摘要 R2R3-MYB 类转录因子参与调控植物初生和次生代谢。本研究从中间锦鸡儿（*Caragana intermedia*）干旱转录组数据库中搜索并克隆了一个 R2R3-MYB 基因，命名为 *CiMYB15*（GenBank 登录号 MH678649）；将 *CiMYB15* 基因编码区转入野生型拟南芥中，利用分光光度法测定了野生型和转基因拟南芥中总黄酮含量，并用 qRT-PCR 检测了转基因植物中 *AtCHS* 基因的表达情况。同时采用染色体步移法克隆了 *CiMYB15* 基因的启动子序列。结果表明：（1）*CiMYB15* 基因 gDNA 长度为 1960 bp，包含三个外显子（134、131 和 521 bp）和两个内含子（281 和 893 bp）；开放阅读框长度为 786 bp，编码 262 个氨基酸。（2）克隆得到 1580 bp 的启动子序列，序列中主要包含损伤诱导元件 G-box 和 P-box、盐诱导作用元件 GT1-motif、参与干旱诱导的反应元件 MBS，以及真菌侵害应答元件 BOX-W1、植物-病原菌互作元件 EIER；此外，还包含调节黄酮合成基因的 MYB 转录因子的结合位点。（3）*CiMYB15* 基因的表达受到紫外胁迫的诱导。（4）*CiMYB15* 基因过表达株系的总黄酮含量高于野生型。（5）过表达植物中 *AtCHS* 基因的表达量亦高于野生型。以上结果说明，*CiMYB15* 基因正调控拟南芥黄酮代谢。

关键词 中间锦鸡儿 总黄酮 *CiMYB15* 基因 启动子 查尔酮合酶基因

中图分类号 Q785 Q786

CiMYB15 from *Caragana intermedia* Positively Regulates Flavonoids Metabolism of Arabidopsis

CHAI Wen-juan[1] YANG Qi[1, 2, 3] LI Guo-jing[1, 2, 3] WANG Rui-gang[1, 2, 3]

（1 College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University; 2 Inner Mongolia Key Laboratory of Plant Stress Physiology and Molecular Biology; 3 Inner Mongolia Scientific Innovation Team of Genetic Resource Utilization and Molecular improvement of Stress Resistant Plants, Hohhot 010018, China)

Abstract R2R3-MYB transcription factors regulate primary and secondary metabolism in plants. A R2R3-MYB encoding sequence, characterized and cloned from drought treated transcriptome of *Caragana intermedia*, was named as *CiMYB15*. The gene was transferred into *Arabidopsis thaliana*, and the total flavonoids contents of transgenic lines and wild type were measured by spectrophotometric method, and the expression of *AtCHS* in transgenic plants was analyzed by qRT-PCR. A 1580bp fragment of *CiMYB15* promoter was isolated by genome walking. The results revealed that: (1) the length of *CiMYB15* gDNA was 1960bp, it's consisted of three exons (134, 131 and 521 bp) and two introns (281 and 893 bp). The open reading frame (ORF) encodes a polypeptide of 262 amino acids. (2)The main cis-elements of *CiMYB15* promoter include abiotic stress responded elements (G-box, P-box, GT1-motif and MBS), biotic stress responded elements (BOX-W1 and EIER), and MYB binding sites of flavonoids synthase regulatory genes. (3) The expression of *CiMYB15* was induced by UV-B. (4) Total flavonoids contents of *CiMYB15* overexpression plants were higher than that of wild type *Arabidopsis*. (5)

* 基金项目：内蒙古自治区科技创新引导项目（KCBJ2018012）、内蒙古自治区科技创新团队（201503004）

**通讯作者，电子信箱：ruigangwang @126.com

Furthermore, the expression level of *AtCHS* was increased in transgenic *Arabidopsis*. In brief, *CiMYB15* positively regulated the flavonoids metabolism.

Key words: *Caragana intermedia*, Total flavonoids, *CiMYB15*, Promoter, Chalcone synthase (*CHS*)

MYB 家族是植物中一个重要的转录因子家族，因其编码的蛋白质含有一个或多个由 51 或 52 个氨基酸组成的 MYB 结构域而得名。MYB 类转录因子一般根据其 MYB 结构域重复数目不同被分为四类：1R-MYB / MYB-related、R2R3-MYB、R1R2R3-MYB 以及 4R-MYB[1]。*R1R2R3-MYB* 类基因通常在动物中探索更多，而 *R2R3-MYB* 类基因则在植物中被广泛研究[2]。*MYB* 基因保守结构域通常具有螺旋-螺旋-转角-螺旋的结构，第二和第三个螺旋所组成的螺旋-转角-螺旋（HTH）空间结构是一个可以结合和稳定 DNA 的疏水核心，其中均匀分布的三个色氨酸残基发挥着主要作用[3, 4]。在 R2R3-MYB 类转录因子中，R3 结构域中的第一个色氨酸有时会被同是芳香族氨基酸的苯丙氨酸（F），或是亮氨酸（L）、异亮氨酸（I）这类疏水性氨基酸所替代[4]。在 C 端和保守的 DNA 结合结构域之间存在一个转录激活功能域，一般由大量酸性氨基酸组成。此外，还有一个不完全界定的负调节域[1]。

第一个被发现的 *v-MYB* 是在禽类成髓细胞白血病病毒（*avian myeloblastosis virus*）中克隆得到，包含三个 MYB 结构域[5]。随后，越来越多的 *v-MYB* 的同源基因相继在其他动物，以及植物、菌类中被分离出来。目前，多种植物 *R2R3-MYB* 基因家族被挖掘，而且成员众多，如拟南芥中有 125 个[6]，大豆（*Glycine max*）中有 244 个[7]，水稻（*Oryza sativa*）中有 109 个[8]，毛果杨（*Populus trichocarpa*）中有 192 个[9]。R2R3-MYB 蛋白 C 端非保守结构域氨基酸高度多样化的特点，决定了同种植物不同的 MYB 转录因子或者同源 MYB 转录因子在不同种植物中的功能不尽相同。数量众多的 R2R3-MYB 转录因子广泛地参与了植物生长发育的调控、初生与次生物质代谢、非生物胁迫及生物胁迫的应答过程[1]。根据 C 端非保守区氨基酸的不同，拟南芥 R2R3-MYB 转录因子家族被分为 22 个亚组，亚组内各成员功能通常比较相似[6]。

黄酮类化合物（flavonoids）广泛存在于植物中，是一类低分子量的多酚类次级代谢产物，对于植物抗病虫害、抵抗非生物胁迫、开花结果及种子等器官着色具有重要意义[10]。黄酮类化合物主要包括黄酮醇（flavonols）、异黄酮（isoflavonoids）、浓缩单宁（condensed tannins）及花青素（anthocyanins）等等，已有 9000 多种黄酮类化合物被发现鉴定[11]。黄酮类化合物的生物合成具有特定的时空特性，影响黄酮类化合物生成途径的主要基因有两类，即结构基因和调节基因。其中，结构基因主要包括苯丙氨酸解氨酶基因（phenylalanine ammonia lyase ，*PAL*）、肉桂酸 4-羟基化酶基因（innamate 4-hydroxylase，*C4H*）、香豆酸辅酶 A 连接酶基因（4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase ，*4CL*）、查尔酮合酶基因（chalcone synthase，*CHS*）、查尔酮异构酶基因（chalcone isomerase，*CHI*）等，CHS 是黄酮合成通路上一个关键限速酶[12]。起到调节作用的主要是由 bHLH、MYB 和 WD40 蛋白所组成的 MBW 三联体[13, 14]。MYB 转录因子主要通过和黄酮合成通路上一些关键酶基因启动子的顺式作用元件相结合，启动或抑制某些基因的表达从而调控黄酮类化合物的合成。已有的启动子结合凝胶阻滞实验分析表明，大多数参与苯丙烷途径的催化酶基因启动子区都具有 AC 富集基序，而许多 R2R3-MYB 转录因子能特异性识别并结合到 AC 富集区域，激活这些基因的表达[15-17]。拟南芥 R2R3-MYB 第 7 亚组的 AtMYB11 、AtMYB12 和 AtMYB111 通过与黄酮合成通路中的 *CHS*、*CHI*、黄酮烷-3-羟化酶（flavanone-3-hydroxylase，*F3H*）以及黄酮醇合成酶（flavonol synthase，*FLS*）基因相结合，完成对黄酮醇代谢的调控；*myb11 myb12 myb111* 三突变体由于第 7 亚组 *MYB* 基因的缺失导致其植株体内不能完成黄酮的积累，但是花青素的合成不受影响[18]。*AcMYB1* 基因是在洋葱（*Allium cepa* L.）黄酮代谢通路侧支上分离得到的一个 *R2R3-MYB* 基因，瞬时过表

达以及 RNAi 实验结果表明 *AcMYB1* 基因正调控洋葱花青素的合成[19]。*MsMYB12* 和 *MsMYB22* 基因在红富士苹果（*Malus sieversii f. niedzwetzkyana*）原花青素和黄酮醇合成过程中起到关键作用，MsMYB12 能与 bHLH3、bHLH33 互作从而调控原花青素的合成，MsMYB22 则直接结合到 *FLS* 基因启动子区来起始黄酮醇的合成 [20]。

中间锦鸡儿（*Caragana intermedia*）属于豆科锦鸡儿属植物，俗称“柠条”。柠条根系发达、叶片小、多有被毛，具有良好的保水作用，对生境要求不高，因此常在西北、华北地区被用作防风固沙的树种[21]。此外，由于其含有丰富的次生代谢物以及豆科特有的黄酮类化合物亦常作药用[10, 22]。本研究从中间锦鸡儿干旱转录组数据库中获得一条编码 R2R3-MYB 转录因子的序列，克隆了该 *MYB* 基因的 cDNA、gDNA 及启动子序列，构建过表达载体并转化野生型拟南芥，研究表明该基因与拟南芥黄酮代谢通路的调控有关。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养

中间锦鸡儿种子采自于内蒙古呼和浩特市和林格尔县。仔细挑选生长饱满、自然成熟且无虫洞的种子播种于培养钵中。营养土和蛭石的比例为 1:3 至 1:5。在 22 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗、7000-8000 lux 光照强度的温室中培养 20 天至 25 天。拟南芥 Columbia 生态型（Col-0）由本实验室提供。拟南芥种子经 70%乙醇和 100%乙醇各灭菌十分钟，在超净工作台晾干，加入无菌水。4℃避光放置 3 天，种于培养钵中用于后续实验。

选取生长良好、长势一致的中间锦鸡儿幼苗（30 天）用于 UV-B 胁迫实验以及 RNA、DNA 的提取，取样时间为 0、0.5、1、3、6、9、12h。剪取幼苗的地上部分并于液氮中速冻，存于-80 ℃备用。选择生长健康、未受胁迫、抽薹的拟南芥，去掉已经结荚的花朵及种荚备用。

1.2 总 RNA 提取和 DNA 的提取

利用 TRIzol（Invitrogen）法对中间锦鸡儿或拟南芥的总 RNA 进行提取。采用 CTAB 法提取中间锦鸡儿的 DNA[23]。1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。同时，使用超微量紫外分光光度计 Q5000（Quawell 公司）对中间锦鸡儿或拟南芥总 RNA 进行定量分析。选取条带清晰且无拖带现象的、定量结果符合要求的总 RNA 样品进行 cDNA 第一条链的合成。

1.3 cDNA 第一条链的合成与基因克隆

对总 RNA 样品进行去 DNA 后，取 1000 ng 中间锦鸡儿总 RNA 或 500ng 拟南芥总 RNA，利用 RTase M-MLV 反转录酶（TaKaRa，大连宝生物工程有限公司），依照反转录试剂盒说明书进行 cDNA 第一条链的合成。根据中间锦鸡儿 *CiMYB15* 基因序列，利用 Primer premier5.0 软件针对 *CiMYB15* 基因 ORF 区设计特异性引物，正向及反向特异性引物分别添加 *Spe* I、*Sal* I 酶切位点（以小写字母表示），用于后续过表达重组载体的构建（表 1）。以中间锦鸡儿 cDNA 第一条链进行基因 ORF 的克隆。基因扩增所用的 Primer STAR 高保真酶、r*Taq* 酶及电泳所用 Marker DL5000、1kb DNA ladder 购自于 TaKaRa（大连宝生物工程有限公司）。PCR 反体系：5×Primer STAR buffer（+Mg^{2+}）10μL，上游（CiMYB15-HA5′）和下游（CiMYB15-HA3′）引物各 2μL（10μmol/L），dNTP（2.5 mmol/L）4μL，模板 1μL，Primer STAR 酶 0.5μL，无菌水 30.5μL。反应条件：98℃预变性 1 min，98 ℃变性 10 s，60 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，反应循环 35 个。72 ℃补充延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳，检测扩增产物，送上海生工生物工程有限公司测序，实验所用引物均合成于此公司。

表 1 *CiMYB15* 基因克隆与功能分析引物信息

Table 1 Primers used in gene cloning and functional analysis

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Usage
CiMYB15-HA5′	GCactagtTAAGATTCAGAGCTCTGGCAATTCT	ORF 和 gDNA 扩增

CiMYB15-HA3′	GCgtcgacATGGTTAGAGCTCCTTGCTGTGAA	Amplication of ORF and gDNA
q-CiMYB15-5′	CTGTAGACTGCGCTGGATTAACTATC	实时荧光定量 PCR
q-CiMYB15-3′	GTTCTTCCTGGTAACTTTGCTGCA	Real-time quantitative PCR
SP1	GTACCTGTTTCCAAGCAACTCATGC	染色体步移克隆启动子
SP2	CGCAGTCTACAGCTCTTTCCACATC	
SP3	GAGGAAGTACCAATTACCAGCATG	Genome walking PCR
AtCHS-5′	GGTGCCATAGACGGACATT	实时荧光定量 PCR
AtCHS-3′	TCCATACTCGCTCAACACG	Real-time quantitative PCR
AtCHI-5′	CTCTATCTGTCAAGTGGAAGG	实时荧光定量 PCR
AtCHI-3′	GAAAACGCAACCGTAAGAG	Real-time quantitative PCR
AtF3H-5′	AGAGGCTTATGAGTTTGGC	实时荧光定量 PCR
AtF3H-3′	TGTAGCAGCAAGGTAATGG	Real-time quantitative PCR
AtFLS-5′	GGATTCTCTCGGATGGATTAG	实时荧光定量 PCR
AtFLS-3′	CGCCGATGTGAACAATGAC	Real-time quantitative PCR
AtDFR-5′	TGGTGGTCGGTCCATTCAT	实时荧光定量 PCR
AtDFR-3′	GAGAGAGCGCGGTGATAAGG	Real-time quantitative PCR
AtEF1α-F	AGAAGGGTGCCAAATGATGAG	实时荧光定量 PCR
AtEF1α-R	CAAAAAGTCCCCTCGTTGTCTC	Real-time quantitative PCR
CiEF1α-F	AGCAATCGTTCTTCCTAATGATCTAA	实时荧光定量 PCR
CiEF1α-R	CAAAAAGTCCCCTCGTTGTCTC	Real-time quantitative PCR

1.4 *CiMYB15* 过表达重组载体的构建

选取测序正确的重组质粒，经 *Spe* I、*Sal* I 双酶切后，将正确的酶切片段，即 *CiMYB15* 基因的 ORF 区与线性化的由 CaMV35S 启动子驱动的植物表达载体 pCanG-HA 相连。利用 *Sal I*、*Sac I* 对重组过表达载体进行酶切验证，确认重组载体连接无误。通过电转化法将重组载体导入农杆菌感受态细胞 GV3101 中，挑取阳性克隆进行菌落 PCR 验证。

1.5 野生型拟南芥遗传转化及转基因植物纯合体筛选鉴定

采用浸花法转化野生型拟南芥，获得 T_0 代转基因植株。在含有卡那霉素（25mg / L）的 1/2 MS（Murashige and Skoog medium）培养基中进行转基因植物的筛选。分别提取野生型和转基因拟南芥总 RNA，反转录得到 cDNA，通过实时荧光定量 PCR 或 RT-PCR 检测转基因拟南芥中 *CiMYB15* 基因表达情况。根据 *CiMYB15* 基因 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物：q-CiMYB15-5′ 和 q-CiMYB15-3′（表 1），以稀释 16 倍的拟南芥 cDNA 为模板，利用 SYBR@ Green I 荧光染料（购于 TaKaRa 公司），在罗氏 Light Cycler480 实时荧光定量 PCR 仪中检测 *CiMYB15* 基因在野生型和过表达株系中的表达水平。拟南芥延伸因子 *AtEF1α*（elongation factor 1-alpha，*EF1α*）作为内参基因。PCR 反应体系：SYBR@ Green I 10μL，上下游引物（q-CiMYB15-5′，q-CiMYB15-3′，10μmol/L）各 4μL，无菌水 4.2μL，模板 5μL。反应条件：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 15 s，40 个循环。反应结束分析熔解曲线，用 $2^{-\Delta CT}$ 法分析数据。每个样品 3 个技术重复。

1.6 *CiMYB15* 基因启动子的扩增及顺势作用元件预测

利用 TaKaRa 公司的 Genome Walking Kit 试剂盒来获取 *CiMYB15* 基因的启动子序列。以 *CiMYB15* 基因 gDNA 序列为模板，设计三条同向（Anti-sense）且退火温度较高（65℃-70 ℃）的特异性引物，分别为 SP1、SP2、SP3（表 1），每个引物之间相隔 100bp 左右碱基，与试剂盒中经过独特设计的退火温度较低的 4 种简并引物（AP1、AP2、AP3、AP4）进行热不对称性 PCR 反应。以中间锦鸡儿 gDNA 为模板，经过 3 轮巢式 PCR 即可获得已知序列的侧翼序列。

将第三轮 PCR 产物进行切胶及胶回收，胶回收产物连接 pMD19-T 载体，转化大肠杆菌感受态，经菌落 PCR 鉴定后挑选阳性克隆进行测序。在 PlantCARE 网站中输入测序得到的序列，对启动子序列进行在线分析预测。

1.7 总黄酮含量测定

采用 70%甲醇超声辅助法提取植物总黄酮。选取生长 1 个月左右的、长势健康、未出现黄叶及病斑的拟南芥，剪碎组织并置于研钵中，室温磨成匀浆。准确称量 0.5g 放于试管中，按 1:20 的料液比加入 70%的甲醇。超声辅助提取 70 分钟，60℃，80Hz。4℃避光过夜静置后，离心取上清液后，利用分光光度法进行总黄酮含量的测定[24]。利用芦丁标样进行标准曲线的制作，芦丁采购于贵州迪大生物科技有限公司。准确称取 1.00mg 芦丁标准品溶于 70%甲醇中，定容到 5ml。分别吸取 0mL、0.1mL、0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL、0.6mL、0.7mL、0.8ml 芦丁标准溶液，依次加入 0.08mL 、5% Na_2NO_2 溶液，混匀并静置 6min。再次加入 0.08mL 、10% $Al(NO_3)_3$ 溶液，混匀并静置 6min。最后加入 4% NaOH 溶液 0.8mL、ddH_2O 0.24mL，混匀并静置 15min。于 510nm 处测定并记录吸光值，在 Excel 表中制作标准曲线。实验组样品测定过程与标准曲线制作实验步骤相同。

2 结果与分析

2.1 *CiMYB15* 基因的克隆和序列分析

从中间锦鸡儿干旱转录组数据库中筛选得到一条 MYB 序列，分析发现该序列包含有完整的开放阅读框（ORF）。以中间锦鸡儿 cDNA 及 gDNA 为模板，利用特异性引物，分别进行 PCR 扩增（图 1a、1 b）。

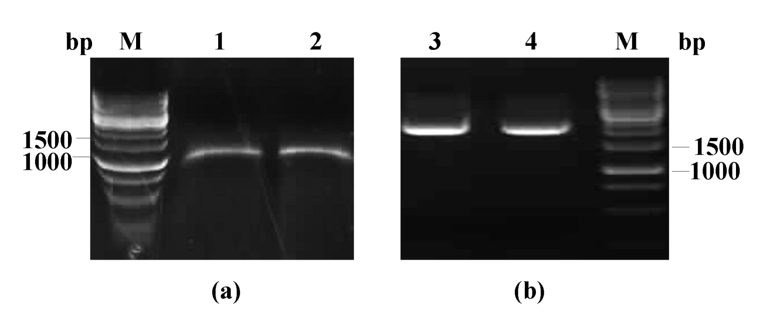


图 1 *CiMYB15* 基因克隆的电泳图

1、2：cDNA 扩增结果；3、4：gDNA 扩增结果；M：1kb 分子量标准

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR products of *CiMYB15*

1, 2: The amplified cDNA; 3, 4: The amplified gDNA; M: 1kb DNA ladder

测序结果显示该序列 ORF 长度为 786 bp，起始密码子为 ATG，终止密码子为 TGA，编码 262 个氨基酸（图 2）。gDNA 长度为 1960 bp，包含三个外显子（134、131 和 521 bp）和两个内含子（281 和 893 bp）（图 2）。在 NCBI Blast 中输入该基因的核苷酸及其编码的氨基酸序列进行检索，发现在拟南芥中与该基因相似度最高的是 *AtMYB15*，因此命名为 *CiMYB15*。

```
1      acaataatagtaatatttttttctagcaaattaattaattaatttgaacATGGTTAGAGCTCCTTGCTGTGAAAAG
                                                        M  V  R  A  P  C  C  E  K
76     ATGGGATTGAAGAAGGGTCCTTGGACCCCAGAGGAAGATGAAATCCTCATATCTTACATCCAAAAACATGGCCAT
        M  G  L  K  K  G  P  W  T  P  E  E  D  E  I  L  I  S  Y  I  Q  K  H  G  H
151    GCCAATTGGCGTGCTCTCCCTAAACATGCTGGgtacttcctcaattacaataagcttttttttttattgatattt
        A  N  W  R  A  L  P  K  H  A  G
226    gatagtgtgtctctataaattcaccatgaacttgatgattgagctagatattccacttttgtgtgttgattttgt
301    tttggtttctctaattgactctgcatgcatgcagCCTATTAAGATGTGGAAAGAGCTGTAGACTGCGCTGGATTA
                                          L  L  R  C  G  K  S  C  R  L  R  W  I
376    ACTATCTAAGACCTGATATCAAGAGAGGAAATTTCACAGATGAAGAGGAGGAAATGATCATTAAGATGCATGAGT
       N  Y  L  R  P  D  I  K  R  G  N  F  T  D  E  E  E  E  M  I  I  K  M  H  E
451    TGCTTGGAAACAGGTgtttgtcttaacctcgtagtagtataagttactaatctagaagaaagcataaaaaaattg
       L  L  G  N  R  W
526    aagtatcgtaattaagatgccaccaatcctgtttagtactgcttaatacaggatgctgtttgatgatcaatacaa
601    ttaagttctgttttcaaaaatggatatgtggttccaatttcttgcttattttatttttttcttaattttctgata
676    attaagtaaacaagatttagtggtgtgggctagtggcgttaacattcaattaattcaaaggagaaaagagttg
751    tgaaattaatttatagcgacgcatatgtgttaataagttataattttattttattatgtgacaaattgttattaa
826    gtaggggacatagaatgtgacagaaaagtgagacaggagattttcatcccccacactccacctctccaaatggat
901    tttcatctcttctctaatgtaaaacattattttgttacaaaatgattataattttaaaataattatgtaattaca
976    ttaaaacaaaaataatttgaaacaaaggggagtaaacaaaacatcaacactattttctgacacttatggatattt
1051   tttggggtgaattgacactttaggatattgttccaatgtcaaaataattcaccagaaatgatgtcaagagaagca
1126   gagaacattgcgtgtatttgtgtatatatatatacaaagacatacatatatacatatacatatacaaatagatac
1201   atgagagagagagagagagagagagagagtagtaagcatgtggggtagcaagattccctgattacatgtgccttgca
1276   cgacacttattgttgtgacaattcatagcacatgcaaaacgtacataccaatatatggatgagatttcttatcaa
1351   tgtaatccaacaatcgatacaatcaaactttgttgttttctcaatcacttcaaccaagaattttaaaacacgaa
1426   tctcatgcaaaaatatctcatgcattaattaaataatctcaatccttgttaattttcagGGTCAGCAATTGCAGC
                                                                 S  A  I  A  A
1501   AAAGTTACCAGGAAGAACAGACAATGAAATAAAAAATGTGTGGCACACTCACTTGAAGAAGAGGCTATTCAAAAC
         K  L  P  G  R  T  D  N  E  I  K  N  V  W  H  T  H  L  K  K  R  L  F  K  T
1576   AAATAACCAACAATCCAATTCAGATGGAAAAAGAGTTTCAAAACCAAAAATCAAACGATCTGGTTCCAATTCCAG
         N  N  Q  Q  S  N  S  D  G  K  R  V  S  K  P  K  I  K  R  S  G  S  N  S  S
1651   CACACTAGCACATTCAGAAACTACATCATCAGGTTGCACTTTTTCTAGTCATTTTTCACCAGAAGGAAAAATTGT
         T  L  A  H  S  E  T  T  S  S  G  C  T  F  S  S  H  F  S  P  E  G  K  I  V
1726   GGACAACAATATGAAGAAGAGTGAAGAAGACCCTTCAGAGTCTATGGTGACAATGCCTGAAATTGATGAAAGTTT
         D  N  N  M  K  K  S  E  E  D  P  S  E  S  M  V  T  M  P  E  I  D  E  S  F
1801   TTGGTCAGAGACTGTAACTGATGATGAATGTTCCACCATGCCATCAAATGAATTACCAAATCACCAATACCCTAA
         W  S  E  T  V  T  D  D  E  C  S  T  M  P  S  N  E  L  P  N  H  Q  Y  P  N
1876   TTTTAATTCAGTGGAGACCTTCCAACACCAAGAGAGTTTTGATTATAGTTCAAACTACTTTGATGATGGCATGGA
         F  N  S  V  E  T  F  Q  H  Q  E  S  F  D  Y  S  S  N  Y  F  D  D  G  M  D
1951   TTTTTGGTATGATTTGTTCCTTAGATCAGGGGAGTCCACAGAATTGCCAGAGCTCtgaatcttaattttcattaa
         F  W  Y  D  L  F  L  R  S  G  E  S  T  E  L  P  E  L
2026   atttggcagataacaaacatttttttaattaaattattagt
```

图 2 *CiMYB15* 的 cDNA、gDNA 及推导的氨基酸序列

下划线标注部分表示内含子区域

Fig. 2 cDNA, gDNA and deduced amino acid sequence of *CiMYB15*

The underlined parts indicate intron regions

CiMYB15 蛋白质的预测分子量为 30.24 kDa，理论等电点是 5.84。利用 HNN 对 CiMYB15 蛋白质的二级结构进行在线预测，其中无规则卷曲所占比例最高，为 66.79%，α螺旋与β折叠所占比例分别为 25.19%和 8.02%。运用 ExPASy 在线数据库中的 ProtScale 工具对氨基酸序列进行亲疏水性分析，结果表明多肽链的平均亲水系数（GRAVY）是-0.909，预示着该蛋白整体上是亲水的。

2.2 CiMYB15 同源性及进化分析

将 CiMYB15 氨基酸序列输入到 NCBI Blast 中，进行检索发现，CiMYB15 与豆科其他物种的 MYB 氨基酸序列具有很高的相似度。对 CiMYB15、拟南芥 AtMYB15（XP_020889427.1）、大豆 GmMYB29（NP_001241360.1）和蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*）MtMYB51（ABR28339.1）进行多序列比对及保守结构域分析显示，CiMYB15 属于典型的 R2R3 类 MYB 转录因子家族，第 13 位到第 63 位氨基酸为 R2 结构域，第 66 到第 114 位氨基酸为 R3 结构域（图 3）。利用分子进化遗传软件 MEGA5.0 构建系统进化树，对 CiMYB15 和其他物种 MYB 蛋白进行聚类分析，结果表明，中间锦鸡儿 CiMYB15 与豆科中的蒺藜苜蓿 MtMYB51 聚在一支，亲缘关系最近，相似度达到 72%；与模式植物拟南芥亲缘关系最近的是 AtMYB15，相似度达到 50%（图 4）。AtMYB15 属于拟南芥 R2R3 转录因子家族第 2 亚组成员，该亚组成员的蛋白 C 端均包含 IDxSFW—MxFWFD 这一保守结构，CiMYB15 也含有该序列[6]（图 3）。

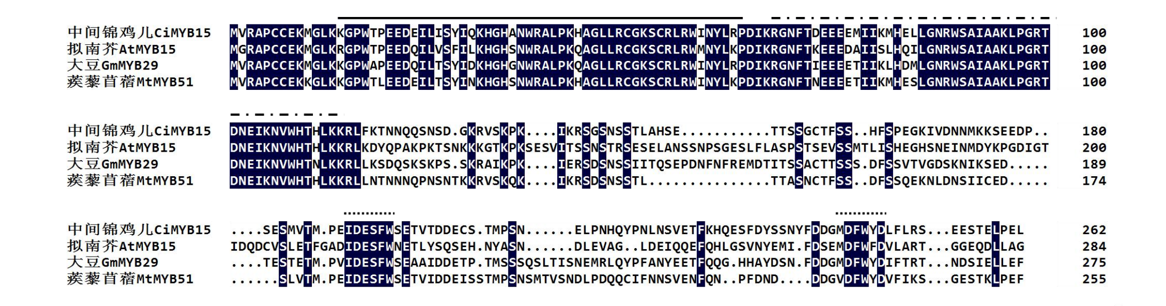


图 3 CiMYB15 和其它植物 MYB 蛋白序列比较

图中从上至下依次为中间锦鸡儿、拟南芥、大豆和蒺藜苜蓿的序列；黑色实线和虚线分别代表 MYB R2 和 MYB R3 结构域，黑色句点标注 IDxSFW—MxFWFD 保守序列

Fig. 3 The alignment of amino acid sequence of CiMYB15 and other plant MYBs

Sequences in this map are obtained from *C. intermedia*, *A. thaliana*, *G. max*, and *M. truncatula* from top to bottom; The black full line and dotted line indicates R2 domain and R3 domain respectively, black points indicate IDxSFW—MxFWFD

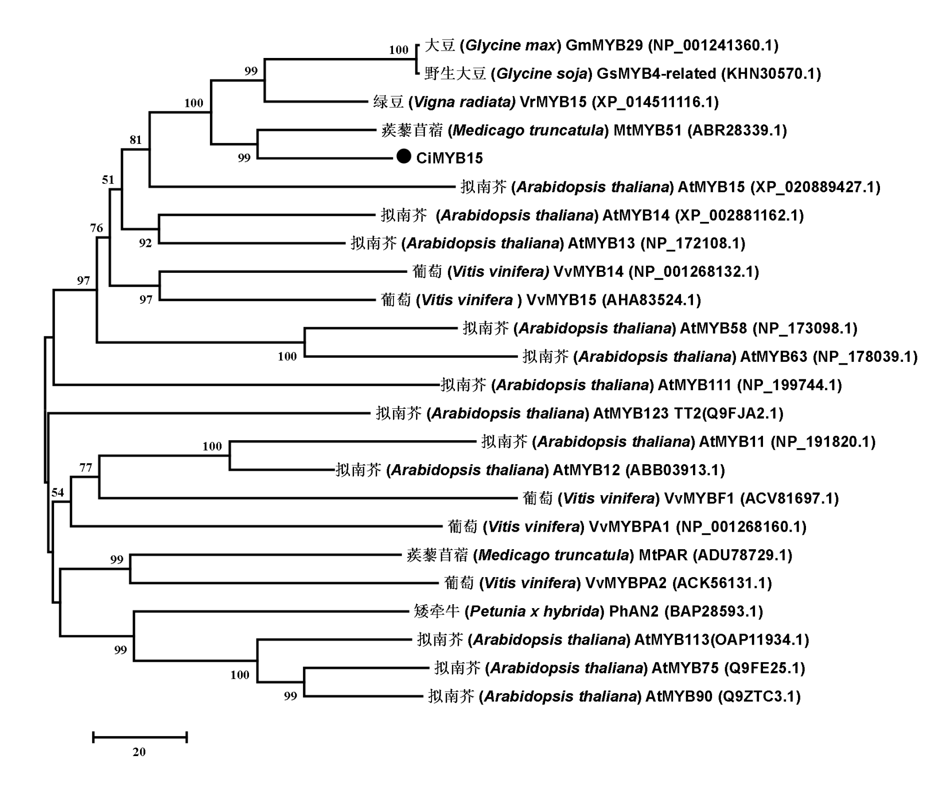


图 4 CiMYB15 与其它植物系统进化分析

采用邻接法构建系统发育树；Bootstrap 设置为 1000 次。

Fig. 4 Phylogenetic analyses of CiMYB15 and other plant MYBs

Phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method; the value of bootstrap replication was set as 1000.

2.3 *CiMYB15* 启动子的克隆与序列分析

2.3.1 *CiMYB15* 启动子的克隆

根据克隆得到的 *CiMYB15* 基因 gDNA 序列设计 3 条同向的特异性反义引物，利用基因组步移试剂盒获得 *CiMYB15* 基因上游的启动子序列。将试剂盒所提供的简并引物 AP1、 AP2、AP3 和 AP4 分别与 3 条特异性引物配对并进行 3 轮巢式 PCR 扩增。测序结果表明简并引物 AP2 与特异性引物的配对成功扩增得到起始密码子 ATG 上游序列，长度为 1580bp（图 5a）。设计特异性引物对 *CiMYB15* 基因启动子进行验证（图 5b）。

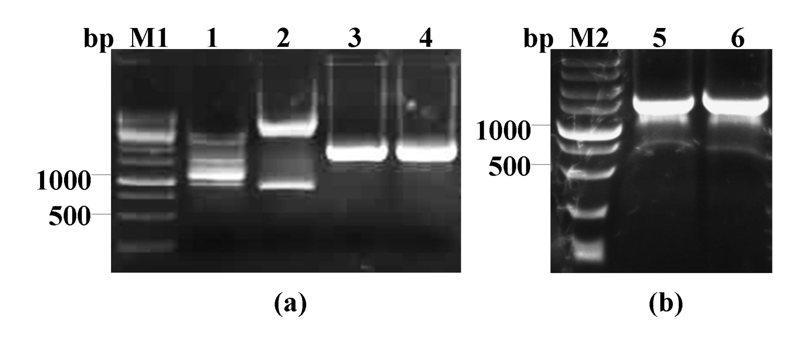


图 5 *CiMYB15* 基因启动子扩增结果

1：第一轮延伸的扩增产物；2：:第二轮延伸的扩增产物；3、4：第三轮延伸的扩增产物；5、6：特异引物扩增产物；M1：1kb 分子量标准；M2：DL5000

Fig. 5 PCR products of *CiMYB15* promoter

1: Product of the first extension; 2: Product of the second extension; 3, 4: Products of the third extension; 5, 6: Products of specific primers; M1: 1kb DNA ladder; M2: DL5000

2.3.2 *CiMYB15* 基因启动子顺式作用元件预测

对 *CiMYB15* 基因启动子序列进行在线分析预测（PlantCARE），寻找其中可能存在的顺式作用元件。分析表明 *CiMYB15* 基因启动子序列具有启动子转录基本核心元件 TATA-box 和 CAAT-box（表 2）。除核心元件外，出现最多的是与光应答有关的顺式作用元件，如 ATC-motif（part of a conserved DNA module involved in light responsiveness）、Box-4（part of a conserved DNA module involved in light responsiveness）、MRE（MYB binding site involved in light）、GAG-motif、GAP-box 和 MNF1。此外，该启动子序列中包含生物胁迫与非生物胁迫有关的顺式作用元件，如真菌侵害应答元件 BOX-W1、植物-病原菌互作元件 EIER，和厌氧诱导响应元件 ARE、损伤诱导元件 G-box 和 P-box、盐诱导作用元件 GT1-motif、参与干旱诱导的反应元件 MBS 以及水杨酸应答元件 TCA-element、茉莉酸应答元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif。其中，MBSI 元件是调节黄酮合成基因的 MYB 转录因子的结合位点。与植物生长调节有关的顺式作用元件也有出现，如分生组织特异性表达元件 CAT-box 和赤霉素响应元件 GARE-motif。

表 2 *CiMYB15* 基因启动子分析预测

Table2 Prediction analysis of the *CiMYB15* promoter

顺式作用元件名称 Name	顺式作用元件功能 Biological function	序列 Sequence	来源物种 Original species
TATA-box	核心元件	TATA	*Arabidopsis thaliana*
CAAT-box	核心元件	CAAAT	*Arabidopsis thaliana*
ARE	厌氧诱导	TGGTTT	*Zea mays*
ATC-motif	光应答元件	AGTAATCT	*Spinacia oleracea*
BOX-4	光应答元件	ATTAAT	*Petroselinum crispum*
MRE	光应答元件	AACCTAA	*Petunia hybrida*
BOX-W1	真菌侵害应答元件	TTGACC	*Petroselinum crispum*
CCAAT-box	MYBHv1 结合位点	CAACGG	*Hordeum vulgare*
TCA-element	水杨酸应答元件	CCATCTTTTT	*Nicotiana tabacum*
		GAGAAGAATA	*Brassica oleracea*
CGTCA-motif	茉莉酸应答元件	CGTCA	*Hordeum vulgare*
TGACG-motif	茉莉酸应答元件	TGACG	*Hordeum vulgare*
EIER	植物-病原菌互作	TTCGACC	*Nicotiana tabacum*

G-box	损伤诱导/光应答元件	CACATGG	*Zea mays*
P-box	与 G-box 协同参与损伤反应	CCTTTTG	*Oryza sativa*
CAT-box	分生组织特异性表达元件	GCCACT	*Arabidopsis thaliana*
GAG-motif	光应答元件	AGAGAGT	*Arabidopsis thaliana*
GAP-box	光应答元件	AAATGGAGA	*Arabidopsis thaliana*
GARE-motif	赤霉素响应元件	TCTGTTG	*Brassica oleracea*
GT1-motif	盐诱导作用元件	GGTTAA	*Arabidopsis thaliana*
MBS	参与干旱诱导反应	GTCAT	*Arabidopsis thaliana*
MBSI	参与黄酮合成基因调控	AAAAAAC（G/C）GTTA	*Arabidopsis thaliana*
MNF1	光应答元件	GTGCCC	*Zea mays*

2.4 紫外处理后 *CiMYB15* 基因的表达检测

结合 *CiMYB15* 基因的启动子及生物信息学分析，为了研究其潜在的功能，对中间锦鸡儿进行 UV-B 胁迫，利用 qRT-PCR 技术检测了紫外胁迫下 *CiMYB15* 基因在转录水平上的变化。结果表明，*CiMYB15* 基因的表达受到紫外胁迫的强烈诱导，呈先上升后下降的趋势，在 6 小时达到最高值，是未处理时的 190 倍左右（图 6）。

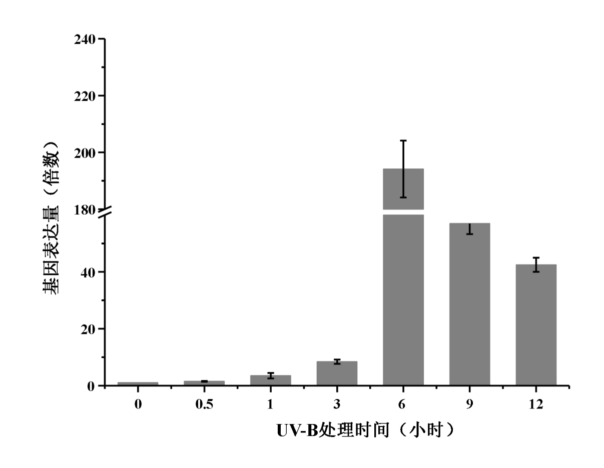


图 6 qRT-PCR 检测 UV-B 处理下 *CiMYB15* 基因的表达水平

选 *CiEF1α*作为内参基因。结果计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。

Fig. 6 CiMYB15 gene expression analysis under UV-B treatment by qRT-PCR

CiEF1α was selected as reference gene. The result was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.5 pCanG-CiMYB15 重组表达载体的构建及过表达纯合体的鉴定

为了研究中间锦鸡儿 *CiMYB15* 基因的功能，通过双酶切法构建了由 35S 强启动子驱动的 pCanG-CiMYB15 重组双元表达载体。使用特异性引物 CiMYB15-HA5′ 和 CiMYB15-HA3′ 扩增得到 *CiMYB15* 基因编码区，长度为 786bp（图 1a）。连接到 p*EASY*-Blunt-Simple 克隆载体上进行测序，之后使用 *Spe* I 和 *Sal* I 对测序正确的质粒进行双酶切，并将酶切片段和线性化的过表达载体 pCanG-HA 相连。*Spe* I、*Sal* I 位于重组质粒中目的基因的两侧，重组载体 pCanG-CiMYB15 双酶切验证后的凝胶电泳检测到 800bp 左右的条带，说明 pCanG-CiMYB15 过表达载体构建成功（图 7，a）。

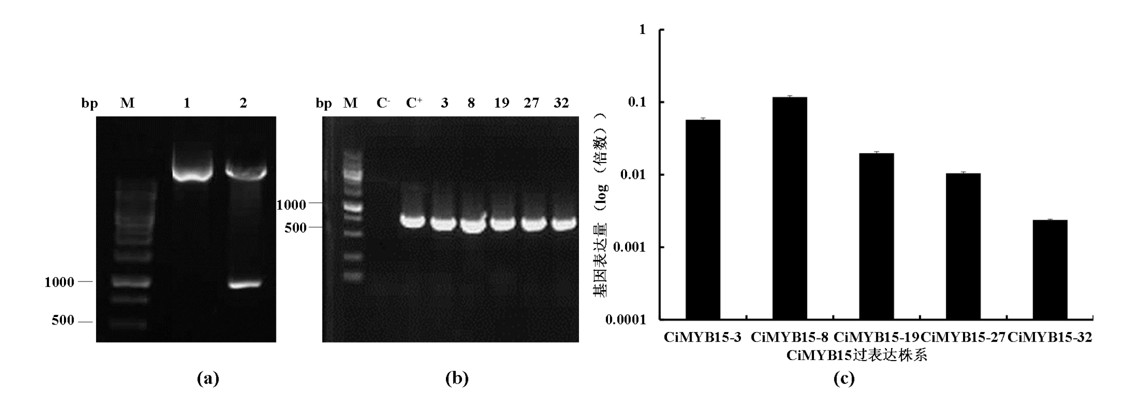


图 7 pCanG-CiMYB15 融表达载体的构建及转基因株系的鉴定

(a) pCanG-CiMYB15 表达载体的酶切验证：1，对照质粒；2：*Spe* I 和 *Sal* I 酶切鉴定；(b) RT-PCR 鉴定 *CiMYB15* 过表达株系： C^-，拟南芥 cDNA 做模板的阴性对照；C^+，柠条 cDNA 做模板的阳性对照；其他数字为过表达株系；(c) *CiMYB15* 过表达株系的 qRT-PCR 鉴定（选择 *AtEF1α*作为内参基因。结果计算采用 $2^{-\Delta CT}$ 法。纵轴用对数轴表示）；M. 1kb 分子量标准

Fig. 7 The construction of recombinant vector pCanG-CiMYB15 and expression analysis of *CiMYB15* in transgenic lines

(a) Identification of the recombinant vector pCanG-CiMYB15: 1, Vector control; 2, The recombinant vector digested by *Spe* I and *Sal* I. (b) RT-PCR assay of *CiMYB15* transgenic lines: C^-, wild type *Arabidopsis* cDNA as negative control; C^+, *Caragana intermedia* cDNA as positive control; Other numbers are overexpression lines. (c) Expression level of *CiMYB15* in transgenic lines was analyzed by qRT-PCR (*AtEF1α* was selected as reference gene. The result was calculated by $2^{-\Delta CT}$. Y-axis was Logarithmic). M: 1kb DNA ladder

采用浸花法将 pCanG-CiMYB15 过表达重组载体转入野生型拟南芥，得到 T_0 代转基因植株。利用浓度为 25mg / L 的卡那霉素筛选转基因植株并获得 T3 代纯合体 5 株。通过 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 对转基因植物中目的基因 *CiMYB15* 进行转录水平检测（图 7b、7c）。选取 3 个表达水平较高的株系，CiMYB15-3、CiMYB15-8 和 CiMYB15-19 进行后续实验。

2.6 *CiMYB15* 基因过表达植物中总黄酮含量升高

通过分析 *CiMYB15* 启动子序列得知，在该基因启动子序列中有调节黄酮合成基因的 MYB 转录因子的结合位点存在，且出现 3 次。由此推测 *CiMYB15* 基因可能与黄酮类化合物代谢有关，于是通过甲醇辅助超声硝酸铝比色法测定了植物体内总黄酮含量。首先利用硝酸铝比色测定法绘制芦丁标准曲线，结果显示芦丁浓度（x）和吸光值（y）呈 y=1.227x-0.0038（R^2=0.9984）的线性关系，芦丁浓度在 0-0.08 mg/ml 范围内线性关系良好（图 8a）。根据公式，通过野生型和各株系测得的 OD 值，可得到滤液中的总黄酮质量浓度，再转化为每克植物鲜重所含有的总黄酮含量。测定结果表明，*CiMYB15* 转基因株系的总黄酮含量高于野生型拟南芥（野生型 wt 为 42.8±6.17μg/g FW，CiMYB15-3 为 52.77±4.97μg/g FW， CiMYB15-8 为 68.44±9.17μg/g FW，CiMYB15-19 为 53.65±9.74μg/g FW），且达到显著差异（图 8b）。其中，CiMYB15-8 过表达株系中 *CiMYB15* 基因的表达量是最高的，与之相对应的，其黄酮含量也是 3 个株系中最高的，表明 *CiMYB15* 基因正向调控黄酮类化合物的生成，并且具有剂量效应。

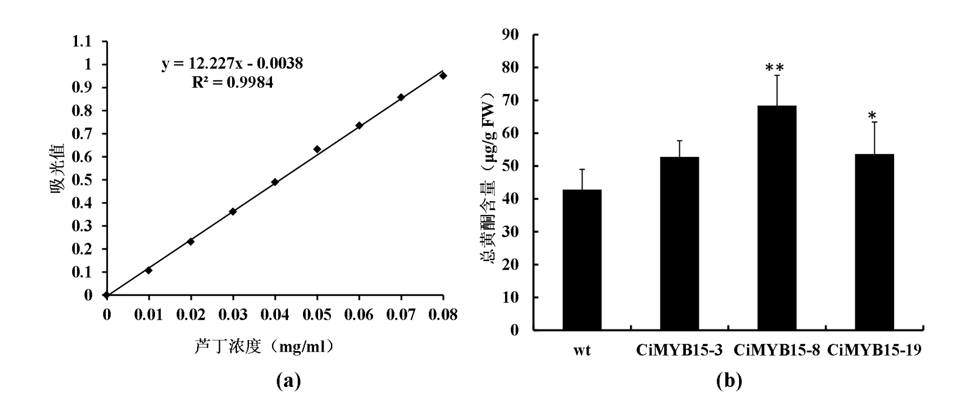


图 8 野生型和 *CiMYB15* 转基因株系中的总黄酮含量

Fig. 8 Total flavonoids content of wild type and transgenic *Arabidopsis* lines

2.7 在拟南芥中过表达 *CiMYB15* 基因影响黄酮合成相关基因的表达

由于转基因植物中黄酮类化合物的含量发生了改变，为了进一步确认 *CiMYB15* 基因对黄酮合成通路相关基因的影响，以野生型和转基因拟南芥 cDNA 为模板，进行了 qRT-PCR 实验的验证。结果表明，黄酮合成通路早期的一个关键酶基因 *AtCHS*，在 *CiMYB15* 基因过表达株系中的表达量出现显著上调（图 9a），但是其他基因（*CHI*、*F3H*、*FLS* 和 *DFR*）的表达相较于野生型并没有明显变化（图 9b）。说明 *CiMYB15* 基因可能在转录水平上正向调控黄酮代谢通路中 *CHS* 基因的表达从而影响黄酮代谢途径。

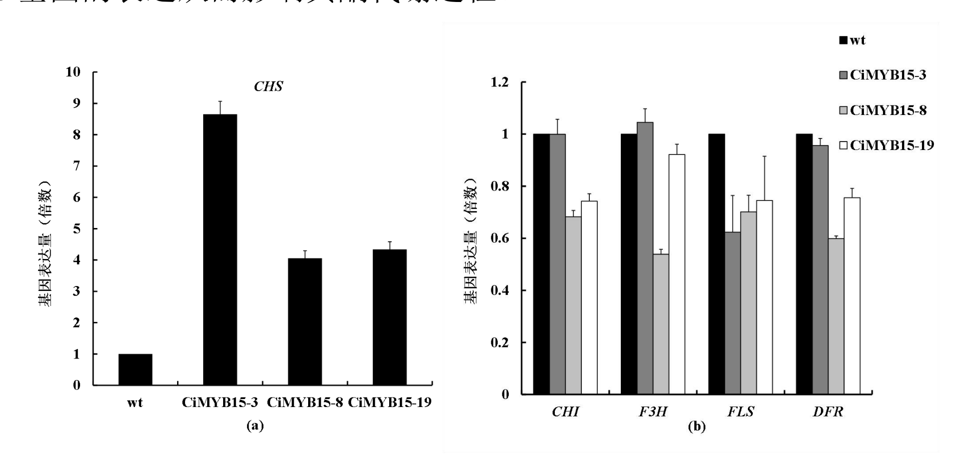


图 9 野生型和 *CiMYB15* 转基因株系中黄酮代谢相关基因的检测

选择 *AtEF1α*作为内参基因。结果计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。

Fig. 9 The detection of flavonoids metabolism related genes from wild type and *CiMYB15* transgenic lines

AtEF1α was selected as reference gene. The result was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3 讨论

植物 R2R3-MYB 转录因子家族，由于成员众多，广泛参与了植物的生长发育、物质代谢及环境胁迫等生物过程。黄酮类化合物不仅对于植物适应环境是必须的，而且作为保健药物促进人体健康也是必不可少的，黄酮类化合物代谢通路的调控依赖于 bHLH、MYB 和 WD40 蛋白所组成的 MBW 三联体。

本研究从中间锦鸡儿干旱转录组数据库中克隆得到 *CiMYB15* 基因，通过多序列比对和进化分析发现，CiMYB15 的 C 端具有 R2R3-MYB 第 2 亚组成员所特有的 IDxSFW—MxFWFD 序列。拟南芥第 2 亚组的成员包括 *AtMYB13*、*AtMYB14* 和 *AtMYB15* 基因，主要功能集中在抵抗非生物胁迫方面[16]。已有研究表明，紫外处理能引起植物体内黄酮醇的积累，尽可能降低紫外光对植物的损伤，黄酮类化合物代谢通路上的关键酶基因 *CHS* 受到紫外处理时会上调

表达[11]。本研究检测了紫外处理的中间锦鸡儿幼苗中 *CiMYB15* 基因的表达情况，结果表明 *CiMYB15* 的表达受紫外胁迫的强烈诱导，这与 *CHS* 基因的表达模式一致。

过表达拟南芥 *AtMYB15* 基因能提高植物的抗旱性，与野生型相比，*AtMYB15* 过表达株系在种子萌发期以及气孔运动中表现出对 ABA 更敏感的表型[25]。此外，AtMYB15 作为冷信号通路中的转录抑制子，能直接结合到 *CBF* 基因启动子区，负调控 *CBF* 基因的表达；同时，MPK6 能特异性与 AtMYB15 发生互作，磷酸化其 168 位的丝氨酸，阻止 AtMYB15 与 *CBF3* 基因启动子区域的结合[26]。在其他一些物种中，*AtMYB15* 的同源基因功能主要与次级物质代谢有关，可能通过调控次级代谢物的生成来调节植物对非生物或生物胁迫的响应。例如，葡萄（*Vitis vinifera*）VvMYB14 和 VvMYB15 通过与 *STS*（Stilene sythnase）基因启动子区结合从而协同调控二苯乙烯苷（stilene）的合成，即苯基丙氨酸可以在 MYBF1、MYBPA1、MYBPA2 的作用下形成黄酮类化合物，或者在 MYB15 的调控下形成二苯乙烯苷[27]。白车轴草（*Trifolium repens*）TaMYB14 转录因子能激活原花青素合成的过程，从而增加植物体内花青素的积累[28]。大豆 *GmMYB29* 也是 *AtMYB15* 的同源基因，在大豆发根中过表达或沉默 *GmMYB29* 基因的表达，可造成异黄酮含量的增加或降低，同时 *GmMYB29* 会调控黄酮代谢通路某些酶基因的表达，如 *PAL*、*4CL*、*CHS*、*IFS* 等[29]。本研究中的中间锦鸡儿 *CiMYB15* 基因也参与调控了黄酮类化合物的代谢。在拟南芥中过表达 *CiMYB15* 基因可增加转基因植物中总黄酮的积累，同时 3 个过表达株系中 *AtCHS* 基因的表达量上调，和 *GmMYB29* 不同的是，*CiMYB15* 在拟南芥中并未明显影响其他黄酮类化合物合成酶基因（*CHI*、*F3H*、*FLS* 和 *DFR*）的表达。说明 CiMYB15 转录因子可能特异性地识别并结合 *CHS* 基因启动子，而造成各物种同源基因功能出现差异的便是 MYB 蛋白 C 端非保守区域高度多样化的氨基酸序列。*CiMYB15* 基因是否能和 *GmMYB29* 一样调控异黄酮的代谢，可能需要将该基因转入豆科植物进行进一步的验证。

参考文献

[1] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci, 2010, 15(10): 573-81.

[2] FELLER A, MACHEMER K, BRAUN E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. The Plant journal : for cell and molecular biology, 2011, 66(1): 94-116.

[3] OGATA K, HOJO H, AIMOTO S, et al. Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(14): 6428-32.

[4] OGATA K, MORIKAWA S, NAKAMURA H, et al. Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. Cell, 1994, 79(4): 639-48.

[5] KLEMPNAUER K H, GONDA T J, BISHOP J M. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. Cell, 1982, 31(2 Pt 1): 453-63.

[6] STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B. The R2R3-*MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. Current opinion in plant biology, 2001, 4(5): 447-56.

[7] DU H, YANG S S, LIANG Z, et al. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. BMC plant biology, 2012, 12: 106-117.

[8] YANHUI C, XIAOYUAN Y, KUN H, et al. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. Plant molecular biology, 2006, 60(1): 107-24.

[9] WILKINS O, NAHAL H, FOONG J, et al. Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. Plant physiology, 2009, 149(2): 981-93.
[10] 杨飞芸，刘坤，崔爽，等. 转 *CiCHS* 基因拟南芥的黄酮代谢及抗氧化能力分析. 西北植物学报, 2018, 38(03): 393-400.
YANG F Y, LIU K, CUI S, et al. Metabolism of flavonoids and the antioxidant capacity of transgenic Arabidopsis thaliana expressing *CiCHS* gene. Acta Bot.Boreal.- Occident. Sin, 2018, 38(3): 0393-0400.
[11] ESPANA L, HEREDIA-GUERRERO J A, REINA-PINTO J J, et al. Transient silencing of CHALCONE SYNTHASE during fruit ripening modifies tomato epidermal cells and cuticle properties. Plant physiology, 2014, 166(3): 1371-86.
[12] YU H N, WANG L, SUN B, et al. Functional characterization of a chalcone synthase from the liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. Plant cell reports, 2015, 34(2): 233-45.
[13] BAUDRY A, HEIM M A, DUBREUCQ B, et al. *TT2*, *TT8*, and *TTG1* synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. The Plant journal : for cell and molecular biology, 2004, 39(3): 366-80.
[14] DEBEAUJON I, NESI N, PEREZ P, et al. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. Plant Cell, 2003, 15(11): 2514-31.
[15] ZHOU J, LEE C, ZHONG R, et al. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2009, 21(1): 248-66.
[16] LEGAY S, SIVADON P, BLERVACQ A S, et al. EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar . The New phytologist, 2010, 188(3): 774-86.
[17] LACOMBE E, VAN DOORSSELAERE J, BOERJAN W, et al. Characterization of cis-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. The Plant journal : for cell and molecular biology, 2000, 23(5): 663-76.
[18] STRACKE R, ISHIHARA H, HUEP G, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis* thaliana seedling. The Plant journal : for cell and molecular biology, 2007, 50(4): 660-77.
[19] SCHWINN K E, NGO H, KENEL F, et al. The Onion (*Allium cepa L.*) R2R3-MYB Gene *MYB1* Regulates Anthocyanin Biosynthesis. Frontiers in plant science, 2016, 7(1865.
[20] WANG N, XU H, JIANG S, et al. MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii f. niedzwetzkyana*). The Plant journal : for cell and molecular biology, 2017, 90(2): 276-92.
[21] YANG Q, YIN J, LI G, et al. Reference gene selection for qRT-PCR in *Caragana korshinskii* Kom. under different stress conditions. Molecular biology reports, 2014, 41(4): 2325-34.
[22] 于秀敏，岳文冉，张燕娜，等. 异源表达 CkLEA1 基因增强了拟南芥对非生物胁迫的耐受性. 中国生物工程杂志, 2016, 36(10): 28-34.
YU X M, YUE W R, ZhangANG Y N, et al. Heterologous of *CkLEA1* Gene Enhanced Tolerance to Abiotic Stress in *Arabidopsis*. China Biotechnology, 2016, 36(10) : 28-34.
[23] ATTITALLA I H. Modified CTAB method for high quality genomic DNA extraction from medicinal plants. Pakistan journal of biological sciences : PJBS, 2011, 14(21): 998-9.
[24] CHUKWUMAH Y, WALKER L T, VERGHESE M. Peanut skin color: a biomarker for total

polyphenolic content and antioxidative capacities of peanut cultivars. International journal of molecular sciences, 2009, 10(11): 4941-52.
[25] DING Z, LI S, AN X, et al. Transgenic expression of *MYB15* confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. J Genet Genomics, 2009, 36(1): 17-29.
[26] KIM S H, KIM H S, BAHK S, et al. Phosphorylation of the transcriptional repressor MYB15 by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in *Arabidopsis*. Nucleic acids research, 2017, 45(11): 6613-27.
[27] HOLL J, VANNOZZI A, CZEMMEL S, et al. The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. Plant Cell, 2013, 25(10): 4135-49.
[28] HANCOCK K R, COLLETTE V, FRASER K, et al. Expression of the R2R3-MYB transcription factor TaMYB14 from Trifolium arvense activates proanthocyanidin biosynthesis in the legumes *Trifolium repens* and *Medicago sativa*. Plant physiology, 2012, 159(3): 1204-20.
[29] CHU S, WANG J, ZHU Y, et al. An R2R3-type MYB transcription factor, GmMYB29, regulates isoflavone biosynthesis in soybean. PLoS genetics, 2017, 13(5): e1006770.